

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年10月9日 (09.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/083112 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09,
5/10, C12Q 1/02, G01N 33/50

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/04180

(22) 国際出願日: 2003年4月1日 (01.04.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-099323 2002年4月1日 (01.04.2002) JP
特願2002-099339 2002年4月1日 (01.04.2002) JP
特願2002-099350 2002年4月1日 (01.04.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術
振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY
CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市

本町4丁目1番8号 Saitama (JP). 国立身体障害者リ
ハビリテーションセンター総長が代表する日本国
(JAPAN AS REPRESENTED BY DIRECTOR GEN-
ERAL OF NATIONAL REHABILITATION CENTER
FOR THE DISABLED) [JP/JP]; 〒359-8555 埼玉県 所
沢市 並木4-1 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

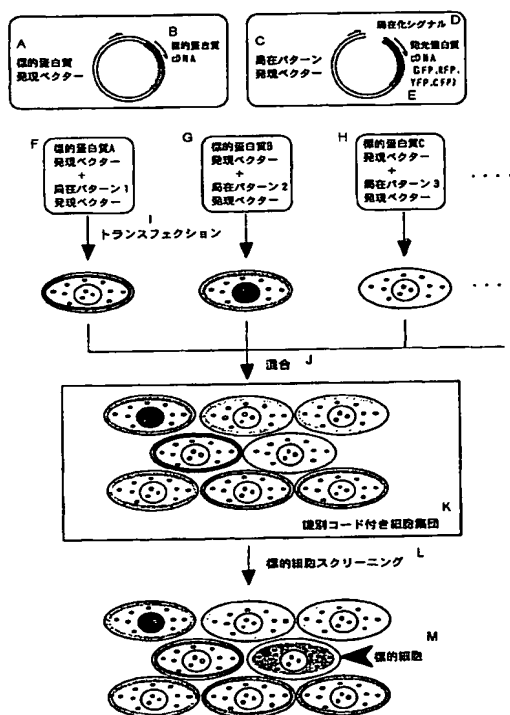
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 加藤 誠志
(KATO, Seishi) [JP/JP]; 〒229-0014 神奈川県 相模
原市 若松3-4 6-5 0 Kanagawa (JP). 藤森 史江
(FUJIMORI, Fumie) [JP/JP]; 〒202-0015 東京都 西東
京市 保谷町4-5-6 ノグチハイツ207号 Tokyo
(JP).

(74) 代理人: 西澤 利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒150-0042
東京都 渋谷区 宇田川町3 7-1 0 麻仁ビル6階
Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: CELL POPULATION PROVIDED WITH IDENTIFICATION CODES AND METHOD OF SCREENING CELL POPULATION

(54) 発明の名称: 識別コード付き細胞集団および細胞集団スクリーニング方法



A... VECTOR EXPRESSING TARGET PROTEIN
B... CDNA OF TARGET PROTEIN
C... VECTOR EXPRESSION LOCALIZATION PATTERN
D... LOCALIZATION SIGNAL
E... CDNA OF LUMINOUS PROTEIN (GFP, RFP, YFP CFP)
F... VECTOR EXPRESSING TARGET PROTEIN A + VECTOR EXPRESSING LOCALIZATION PATTERN 1
G... VECTOR EXPRESSING TARGET PROTEIN B + VECTOR EXPRESSING LOCALIZATION PATTERN 2
H... VECTOR EXPRESSING TARGET PROTEIN C + VECTOR EXPRESSING LOCALIZATION PATTERN 3
I... TRANSFECTION
J... MIXING
K... CELL POPULATION PROVIDED WITH IDENTIFICATION CODES
L... SCREENING TARGET CELL
M... TARGET CELL

(57) Abstract: It is intended to provide a cell population distinguishable from each other based on a difference in luminous signals emitted from luminous bodies wherein the difference in the luminous signals is caused by either or both of (a) 2 or more different luminous characteristics, and (b) 2 or more

[続葉有]



(81) 指定国 (国内): CA, US.

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

different luminous sites. The cell population provided with identification codes can be conveniently prepared without resort to any special apparatus and applied to both of a solid phase and a liquid phase in mass screening. Moreover, this cell population is applicable to a screening concerning various properties of cells such as the expression of a target protein.

(57) 要約: この出願の発明は、発光物質の発する発光シグナルの違いによって個々に識別可能な細胞の集団であって、発光シグナルの違いが、(a)発光特性が異なる2以上であること、(b)発光部位が異なる2以上であること、のいずれか一方または両方である識別コード付き細胞集団を提供する。この識別コード付き細胞集団は、特別な装置を必要とせずに簡便に作製することができ、大規模なスクリーニングを固相系および液相系の双方において実施可能であり、しかも標的蛋白質の発現を含めた様々な細胞の性質についてのスクリーニングにも適用可能である。

明細書

識別コード付き細胞集団および細胞集団スクリーニング方法

5

技術分野

この出願の発明は、識別コード付き細胞集団と、この細胞集団のスクリーニング方法に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、識別コードと
10 しての発光シグナルの違いによって個々の細胞が識別可能であり、発現クローニングによる遺伝子探索、蛋白質-蛋白質相互作用の検出等に有用な細胞集団と、この細胞集団の利用発明に関するものである。

15

背景技術

ゲノムプロジェクトにおいて多くの新規遺伝子が発見されている。これらの新規遺伝子がコードしている蛋白質の機能を調べたり、それらの蛋白質を利用して新しい医薬品を開発するためには、それらの蛋白質（標的蛋白質）と結合する物
20 質を見つける必要がある。そこで、そのためのアッセイ法が種々開発されてきた（E. M. Phizicky and S. Fields, Microbiol. Rev. 59:94-123, 1995; A. R. Mendelsohn and R. Brent, Science 284: 1948-1950, 1999）。最も一般的な方法は、複数の標的蛋白質を担体に固定し、これに標識したプローブを作用させて、結合するかどうかを調べる方法である。従来、標的蛋白質の固定化が容易なウエ
25 スタンプロットティング法と ELISA 法が広く用いられているが、次のような問題点がある。

- (1) 多量の標的蛋白質を調製する必要がある。
- (2) 標的蛋白質の単離精製に、時間と労力を要する。
- (3) 単離精製や固定化の過程で標的蛋白質が分解・変性することがある。
- 30 (4) スクリーニングするのに多量のプローブが必要である。

この中の(1)と(4)の問題点を解決するために、最近、蛋白質マイクロアレイ法が開発された。すなわち、標的蛋白質をスライドガラス上の微少領域に格子状に高密度で固定化した蛋白質チップを用いる方法である (MacBeath & Schreiber, Science 289:1760-1763, 2000)。

しかしながら、この蛋白質チップでも、(2)と(3)の問題点は残されていた。そこで、標的蛋白質の単離精製プロセスを省くために、標的蛋白質の発現ベクターをスライドガラス上に格子上のスポットに固定したのち、この上で細胞を培養し、発現ベクターを培養細胞内に導入することによって、標的蛋白質発現細胞を格子状に配置した細胞チップを作製し、各細胞が発現する標的蛋白質にプローブを作用させる方法も開発されている (J. Ziauddin & D.M. Sabatini, Nature 411:107-110, 2001)。この方法は、蛋白質を単離精製したり、担体上へ固定配置したりする行程は省略することができる。しかしながら、この細胞チップの作製には、発現ベクターを1スポットずつ固定するために、アレイアーやドットブロッターのような特別の装置を必要とし、しかも発現ベクターは一定間隔を置いて1スポットずつ固定するため、1枚の担体に固定配置することのできる標的蛋白質発現細胞の種類は制限され、多数の標的蛋白質を1枚の細胞チップで試験することができないという問題点を有してもいた。さらにまた、前記の細胞チップの場合には、スライドガラス上にスポット固定した発現ベクターの位置とその種類によって個々の細胞を特定するため、必然的に固相系スクリーニングに限定され、しかもベクターから発現される標的蛋白質のみがスクリーニングの対象であって、細胞それ自体の性質の違いをスクリーニング対象とすることができないという問題点を有してもいた。

この出願の発明は、特別な装置を必要とせずに簡便に作製することができ、大規模なスクリーニングを固相系および液相系の双方において実施可能であり、しかも標的蛋白質の発現を含めた様々な細胞の性質についてのスクリーニングにも適用可能な新しい細胞集団を提供することを課題としている。

またこの出願の発明は、前記の細胞集団を利用して、細胞の様々な性質をスクリーニングする方法を提供することを課題としている。

5

発明の開示

この出願の発明は、発光物質の発する発光シグナルの違いによって個々に識別可能な細胞の集団であって、発光シグナルの違いが、

- (a) 発光特性が異なる 2 以上であること；
 - 10 (b) 発光部位が異なる 2 以上であること
- のいずれか一方または両方である識別コード付き細胞集団を提供する。

15

この細胞集団においては、一部または全ての細胞の発光物質が蛍光蛋白質であること、あるいは一部または全ての細胞が蛍光蛋白質と局在化シグナルペプチドとの融合蛋白質を発現することを好ましい態様としている。

20

またこの細胞集団においては、各細胞がそれぞれに異なる性質を有する細胞であること、さらには異なる性質が異なる標的蛋白質の発現であることを好ましい態様としている。

さらにまた、この細胞集団においては、細胞が真核細胞であること、真核細胞が哺乳動物細胞であることをそれぞれ好ましい態様としている。

25

この細胞集団は、また、担体上の微小領域に高密度で固定配置されていることを別の好ましい態様としている。

この発明は、さらに、前記の異なる性質を有する細胞集団の各細胞にプローブを接触させ、細胞の発光シグナルを指標としてプローブと結合する細胞の性質を同定することを特徴とする細胞性質スクリーニング方法を提供する。

30

このスクリーニング方法においては、プローブがプローブ蛋白質と蛍光蛋白質との融合蛋白質プローブであること、蛍光蛋白質が、識別コード付き細胞集団が有する発光特性とは異なる発光特性を有することをそれぞれ好ましい態様として

5

いる。
さらにこのスクリーニング方法においては、融合蛋白質プローブがプローブ蛋白質遺伝子と蛍光蛋白質遺伝子との融合遺伝子のインビトロ転写・翻訳産物であることを好ましい態様としてもいる。

- 10 以上の各発明における態様や用語、概念は、発明の実施形態の説明や実施例において詳しく規定する。またこの発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。例えば、この発明の遺伝子工学および分子生物学的技術は Sambrook and Maniatis, in Molecular Cloning-A Laboratory
15 Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N. Y, 1995 等に記載されている。

20

図面の簡単な説明

図 1 は、この発明の識別コード付き細胞集団の作製工程並びにこの細胞集団を用いたスクリーニング工程を模式的に表示した図である。

25

図 2 は、実施例として、この発明の細胞集団にそれぞれ導入した融合蛋白質の構造を表示した図である。GPCL-XFP (a)、MHIBDH-XFP (b)、ACoABPL-XFP (c)、ARH-XFP (d) をそれぞれ示す。ここで、XFP は、EGFP、EYFP、DsRED2 のいずれかを表す。また、図中、TMD は膜貫通ドメインを、MtLS はミトコンドリア局在化シグナルを、NLS は核局在化シグナルをそれぞれ表す。

30

図 3 は、この発明の識別コード付き細胞集団を観察した共焦点顕微鏡写真像である。GPCL-EGFP/ARH-DsRed2 (a)、GPCL-DsRed2/ARH-EYFP (b)、GPCL-EYFP/ARH-DsRed2 (c)、GPCL-DsRed2/MHIBDH-EGFP (d)、GPCL-EYFP/MHIBDH-DsRed2 (e)、ACoABPL-EGFP/ARH-DsRed2 (f)、ACoABPL-EYFP/ARH-DsRed2 (g)、ACoABPL-DsRed2/ARH-EGFP (h)、GPCL-DsRed2/ACoABPL-EGFP (i)、MHIBDH-DsRed2/ACoABPL-EGFP (j)、GPCL-EGFP/ARH-DsRed2 (k)、GPCL-DsRed2/ARH-EYFP (l)、GPCL-EYFP/ARH-DsRed2 (m)、GPCL-EGFP/MHIBDH-DsRed2 (n)、MHIBDH-EGFP/ARH-DsRed2 (o)をそれぞれの組み合わせで発現させた細胞を示す。細胞として、(a)から(j)までは、HT-1080細胞を、(k)から(l)までは、COS7細胞をそれぞれ用いた。

図 4 は、5種類の融合蛋白質（GPCL-EGFP、MHIBDH-EGFP、MHIBDH-DsRed2、ACoABPL-DsRed2、ARH-EYFP）を発現する細胞からなる蛋白質チップを観察した共焦点顕微鏡写真像である。微分干渉像 (a)、蛍光画像 (b) をそれぞれ示す。目盛りの単位は μm である。

図 5 は、インビトロ転写・翻訳によって調製した蛍光蛋白質融合プローブを用いて、標的蛋白質を発現する細胞を含む細胞チップをスクリーニングする方法を模式的に表示した図である。

図 6 は、実施例に用いた融合蛋白質の構造を表示した図である。NpwBP (P2)-EGFP (a)、GPCL-Npw38 (b)、GPCL-Npw38-DsRed2 (c) をそれぞれ示す。

図 7 は、インビトロ転写・翻訳によって調製した蛍光蛋白質融合プローブの蛍光スペクトルである。

図 8 は、蛍光蛋白質融合プローブが細胞チップの標的蛋白質と結合した時の蛍光発光を観察した共焦点顕微鏡写真像であって、GPCL-Npw38 発現細胞を含む細胞チップを用いた場合の緑色蛍光 (a)、これを微分干渉像と重ね合わせたもの (b)、GPCL-Npw38-DsRed2 を発現させた細胞を含む細胞チップを用いた場合の緑色蛍光 (c) と赤色発光 (d)、両者を微分干渉像と重ね合わせたもの (e) を示す。

発明を実施するための最良の形態

5 この発明の識別コード付き細胞集団は、発光物質の発する発光シグナルの違いによって個々に識別可能な細胞の集団であって、発光シグナルの違いが、

(a) 発光特性が異なる 2 以上であること；

(b) 発光部位が異なる 2 以上であること

のいずれか一方または両方であることを特徴とする。

10

「発光特性が異なる」とは、顕微鏡による観察によって、互いに他の特性と区別できることを意味する。そのような特性とは、例えば色彩や明暗強度等である。また、発光の形態は、蛍光であっても燐光であってもよい。

15

「発光物質」は、公知の天然発光物質または化学合成物質、例えば蛍光色素化合物、蛍光蛋白質、蛍光半導体（量子ドット）などを用いることができる。蛍光色素化合物としてはフルオレセインイソチオシアネート（FITC）やテトラメチルローダミンイソチオシアネート（TRITC）等、蛍光蛋白質としては発光クラゲ由来の緑色蛍光蛋白質（GFP）や、その変異体である EGFP、EYFP（黄色蛍光）、ECFP（青色蛍光）、DsRed1（赤色蛍光）、DsRed2、ウミシイタケ由来の緑色蛍光蛋白質 hrGFP 等、
20 蛍光半導体としては各種発光色の異なる量子ドットを用いることができる。この発明においては、細胞集団を構成する全ての細胞が同一タイプの発光物質を識別コードとしてもよく（例えば全ての細胞が色彩の異なる蛍光蛋白質を識別コードとする）、あるいは一部の細胞が蛍光色素化合物を識別コードとし、他の細胞が蛍光色素化合物とは色彩の異なる蛍光蛋白質を識別コードとしてもよい。この発明では、特に一部または全ての細胞が蛍光蛋白質を識別コードとすることを好ましい態様としている。

25

「発光部位が異なる」とは、細胞の発光部位が異なることを意味する。細胞部
30 位は、顕微鏡観察によって発光部位が特定可能な局在部位であればいかなるもの

でもよい。例えば、オルガネラ（ミトコンドリア、ペルオキシソーム、エンドソームなど）、核、核内構造物（核小体、スプライセオソームなど）、細胞質構造物（微小管、アクチンフィラメント、中間フィラメントなど）、内膜系（小胞体、ゴルジ体など）、細胞膜などが例示できる。

5

以上のとおりの「異なる発光特性」と「異なる発光部位」との組み合わせ（以下、「発光シグナルパターン」と記載することがある）は、発光部位が n 種類（ n は 1 以上の自然数）で、それぞれについて発光特性が m 種類（ m は 1 以上の自然数）の場合、これらの組み合わせ数は次の式で表される。

$$\sum_{i=1}^N {}_nC_i \times m^i$$

10 例えば、発光特性（例えば色）の異なる 3 種類の発光物質を用い、発光部位を 1~4 部位とした場合には、理論的には次のような組み合わせで合計 255 種類の発光シグナルパターンが得られる。

1 部位の場合： ${}_4C_1 \times 3 = 12$ 種類

2 部位の場合： ${}_4C_2 \times 3^2 = 54$ 種類

15 3 部位の場合： ${}_4C_3 \times 3^3 = 108$ 種類

4 部位の場合： ${}_4C_4 \times 3^4 = 81$ 種類

さらに、4 色と 4 部位の組み合わせとした場合には、発光シグナルパターンは合計で 624 種類となる。

20 1 部位の場合： ${}_4C_1 \times 4 = 16$ 種類

2 部位の場合： ${}_4C_2 \times 4^2 = 96$ 種類

3 部位の場合： ${}_4C_3 \times 4^3 = 256$ 種類

4 部位の場合： ${}_4C_4 \times 4^4 = 256$ 種類

25 発光物質を細胞の特定の部位に局在化して発光させるためには、発光物質を「細胞内局在化誘導物質」を介して細胞の特定部位に結合させる。細胞内局在化誘導物質としては、局在化シグナルペプチド、抗体、蛋白質の結合モチーフを含

むペプチド、天然物質、合成物質等を用いることができる。発光物質と細胞内局在化誘導物質との結合は、共有結合、イオン結合、疎水結合などいかなる結合でも良いが、解離しにくい共有結合であることが好ましい。両者の結合は担体（蛋白質、合成高分子、有機化合物、無機物質など）を介しても良い。

5

発光物質および／または細胞内局在化誘導物質の細胞内への取り込みは、エンドサイトーシスによる取り込み、トランスフェクション試薬などの輸送担体を用いた取込み、細胞表面への結合、遺伝子発現による細胞内生産等の方法を適宜に組み合わせて行うことができる。例えば、細胞内局在化誘導物質（例えば、蛍光蛋白質に特異的に結合する抗体）をコードする遺伝子を細胞の特定部位に発現させ、この細胞にエンドサイトーシス等によって蛍光蛋白質を導入すれば、蛍光蛋白質を細胞内の特定部位に局在化させることができる。なお、この発明においては、遺伝子発現による方法（蛍光蛋白質と局在化シグナルペプチドの融合蛋白質の細胞内発現）によって発光物質を局在化した細胞集団を好ましい態様としている。また、蛍光蛋白質と局在化シグナルペプチドの融合蛋白質を発現する細胞は、細胞集団を構成する全ての細胞であってもよく、あるいは一部の細胞であってもよい。すなわちこの発明においては、細胞集団を構成する各細胞が互いに他の細胞と区別して識別されることを条件として、様々な発光物質を識別コードとする細胞が混在していてもよい。そのような細胞の混在は、細胞の種類、スクリーニングやアッセイ対象となる細胞の性質や標的蛋白質の種類等によって、それぞれ適した細胞を選択して行うことができる。

10

15

20

25

30

蛍光蛋白質と局在化シグナルペプチドの融合蛋白質を発現する細胞集団の作製法を図1に示した。すなわち、複数種類の蛍光蛋白質のN末端やC末端に局在化シグナルペプチドを融合させて、局在化シグナル付き蛍光蛋白質の発現ベクターを作製する。これらの発現ベクターを様々な組み合わせで細胞内に導入し、それぞれを共発現させることによって、目的とする発光局在パターンが得られる。蛍光蛋白質としては、緑色蛍光蛋白質、赤色蛍光蛋白質、黄色蛍光蛋白質、青色蛍光蛋白質などがあげられる。局在化シグナルペプチドとしては、オルガネラ（ミトコンドリア、ペルオキシソーム、エンドソームなど）、核、核内構造物（核小体、

スプライセオソームなど)、細胞質構造物(微小管、アクチンフィラメント、中間フィラメントなど)、内膜系(小胞体、ゴルジ体など)、細胞膜などへの局在化を引き起こす局在化シグナルペプチドが用いられる。なお、「局在化シグナルペプチド」は、局在化シグナルを有する全長蛋白質であってもよく、局在化シグナルを含む蛋白質の一部であってもよく、さらには局在化シグナルを構成するアミノ酸配列からなるペプチドであってもよい。

発現ベクターとしては、例えば真核細胞を対象とする場合にはプロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターであれば、プラスミドベクター、ウイルスベクターを問わずいかなるものでもよく、pKA1、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBVベクター、pRS、pYES2などが例示できる。これらのベクターに、蛍光蛋白質をコードするcDNAと局在化シグナルをコードするDNA断片をクローン化して発現ベクターを作製する。発現ベクターを真核細胞に導入するには、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法など公知の方法を用いることができる。また、例えば生体認識分子を提示した中空ナノ粒子、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等を用いる遺伝子治療法(ex vivo法)に準じた方法によっても局在化シグナル付き蛍光蛋白質を真核細胞で発現させることができる。

なお、蛍光蛋白質に局在化シグナルを融合させて、局在パターンの異なる蛍光蛋白質を細胞内で発現させることは広く行なわれているが(例えば、CLONTECHniques April, 2000)、異なる発光局在パターンを個々の細胞に付与し、これによって細胞集団の個々の細胞を識別するという発想はこれまでなかった。

この発明の細胞集団を構成する「細胞」は、原核細胞および真核細胞のいずれでもよいが、真核細胞は複数の局在化部位を利用することができるので、より多くの種類の発光局在パターンが得られるため好ましい。真核細胞としては、例えば、サル腎臓細胞COS7、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHO、各種ヒト腫瘍株化細胞などの哺乳動物培養細胞、出芽酵母、分裂酵母、カイコ細胞、アフリカツ

メガエル卵細胞などが例示できる。あるいはまた、動物から単離した初代培養細胞であってもよい。また、混合培養が可能であれば、由来する種や組織が異なる2種類以上の真核細胞を用いても良い。さらに、浮遊細胞および付着細胞のいずれの細胞でもよいが、細胞集団を担体上に固定して利用する場合には付着細胞が好ましい。

この発明の細胞集団における第1の形態は、発光シグナルパターンが異なり、その他の性質は同一である細胞の集団である。このような細胞集団は、その後の処理によって個々の細胞に「異なる性質」を付与することによって、各種のスクリーニングやアッセイ法に使用することができる。

この発明の細胞集団における第2の形態は、発光シグナルパターンが異なり、さらに異なる性質を有する細胞の集団である。この場合の「異なる性質」とは、外来遺伝子を導入することによって新しい遺伝子型を付与すること、物理的あるいは化学的処理をすることによって性質を変化させることなどを意味する。あるいはまた、例えば、由来する種、器官、組織が異なるため、個々に遺伝子型または表現型が異なることを意味する。例えば、発光シグナルパターンが異なる同一性質細胞の集団に、それぞれ異なる蛋白質発現ベクターを導入することによって、発現した標的蛋白質の異なる細胞ライブラリーが構築される。そして、特定のプローブ等に反応する細胞が発現している標的蛋白質の種類は、その細胞の発光局在パターンによって即座に特定される（図1参照）。あるいはまた、例えば放射線等の物理的処理や発癌性物質等の化学的処理によって、様々な組織等に由来する癌化細胞を含む細胞集団が得られる。そして、特定のプローブ（例えば癌細胞特異的抗体など）に反応する細胞の種類を、その細胞の発光シグナルによって即座に特定することができる。

このような異なる性質を有する細胞集団は、先ず性質の異なる細胞集団を調製し、この細胞集団の個々の細胞に異なる発光シグナルパターンを付与するようにする。また、外来遺伝子発現ベクターの導入によって異なる性質を付与し、局在化シグナル付き蛍光蛋白質の発現ベクターの導入によって異なる発光シグナルパ

ターンを付与する場合には、2つのベクター導入を同時に行ない、導入した遺伝子を共発現させても良い。

5 なお、外来遺伝子発現ベクターの導入によって発現させる「標的蛋白質」は、
ヒトを含めたあらゆる生物種由来の、あらゆる蛋白質を対象とすることができる。
その機能が既知であってもよく、あるいは機能未知のものであってもよい。標的
蛋白質のアミノ酸配列、またはそれをコードする DNA 配列は未知であってもよい
が、既知であることが好ましい。アミノ酸配列は、天然に存在する蛋白質由来の
10 配列であっても、人工的にデザインした配列であってもよい。さらにこの標的蛋
白質は、天然蛋白質のアミノ酸配列における一部連続配列からなるポリペプチド
またはオリゴペプチドであってもよい。

15 この発明の識別コード付き細胞集団は、前記のとおり、各細胞の発光シグナル
パターンがそれぞれに異なることによって、1個の細胞を他の細胞と区別して識
別することができる。そのため、例えば細胞の性質（例えば標的蛋白質）の種類
と発光シグナルパターンとを対応させておけば、特定プローブが反応する細胞が
どのような性質または標的蛋白質を発現する細胞であるかを即座に判定すること
ができる。

20 またこの発明の識別コード付き細胞集団は、目的とするスクリーニング法やア
ッセイ法に応じて、個々の細胞を担体に固定化した状態で用いることもできるし、
浮遊状態で用いることもできる。例えば、これらの細胞を懸濁させて浮遊状態で
種々の反応を行ない、この中から反応が起こったものを選別することもできる。
例えば 1,000 種類の細胞を μ l あるいは nl オーダーの溶液に懸濁させることに
25 よって極微量スケールのアッセイが可能である。これらのスクリーニングによっ
て特定の性質を有する細胞が選別された時、その細胞を蛍光顕微鏡下で観察する
ことにより、その発光局在パターンからその細胞の性質を直ちに判定することが
できる。

30 一方、標的蛋白質を発現させた細胞の中からプローブと結合するものをスクリ

ーニングする場合には、細胞集団を担体上に固定化した状態で使用することも好ましい（以下、担体上に固定化した細胞集団を「細胞チップ」と記載することがある）。この細胞チップは、発光シグナルパターンが異なり、かつ、異なる性質を有する細胞集団の混合培養物を、担体上の微小領域に高密度で固定配置することによって作製することができる。細胞集団は、異なる標的蛋白質をそれぞれに発現する真核細胞の集団を使用することが好ましい。この場合には、担体上に固定配置する「真核細胞の混合培養物」は、それぞれに異なる標的蛋白質を発現する複数種の真核細胞を、それぞれ均等（例えば、各細胞1個ずつ）に混合培養してもよく、あるいは特定の1種以上の細胞を他の細胞より多く、または少なく混合培養してもよい。真核細胞の混合培養物を調製するには、それぞれの細胞を個別に培養してから混合する方法と、予め混合した細胞を培養する方法のいずれを採用することもできるが、混合比を正確に制御できることから、前者が好ましい。その場合、個別に培養した細胞をプロテアーゼ処理などによって培養器から剥離させ、それぞれに所定の数の細胞を含む懸濁液を調製し、それぞれの懸濁細胞液を各細胞が均一になるように十分混合したのち、細胞チップの担体の上に蒔き、さらに培養を続ける。この時、植える細胞数をコントロールし、あるいは細胞の種類を選ぶことによって、1 mm² 当たり最大 5,000 個の高い細胞密度のチップが得られる。

混合細胞を培養し固定するための担体としては、培養細胞が接着でき、顕微鏡観察が可能な透明のものであれば、その材質はいかなるものであってもよく、例えばスライドガラスやプラスチック製の培養容器が例示できる。また、コラーゲンやラミニン等の蛋白質によるコート処理、あるいは化学的な処理によって、担体表面の細胞接着能が高められているものも用いられる。

以上の方法によって作製された細胞チップは、発現パターンの違いによってそれぞれが発現する標的蛋白質が特定可能である複数種の真核細胞が、担体上の微小領域に高密度でランダムに固定配置されている。そして、ランダムに配置されている各細胞が発現する標的蛋白質は、前記のとおり、それぞれの発現パターンの違いによって特定可能である。なお、このような細胞チップは、真核細胞を担

体上に固定した後ただちにプローブと反応させてスクリーニングに用いることができる。あるいは、パラホルムアルデヒドなどで固定してもよい。さらには、冷凍庫で使用时まで保存することもできる。

- 5 この発明のスクリーニング方法は、識別コード付き細胞集団の各細胞にプローブを接触させ、細胞の発光シグナルを指標としてプローブと結合する細胞の性質を同定することを特徴とする。浮遊細胞集団を対象として液相系で行うこともでき、あるいは前記の細胞チップを用いた固相系で行うこともできる。ただし、標的蛋白質とプローブとの結合を対象とする場合には細胞チップによる固相系での
- 10 実施が好ましい。このスクリーニング方法は、高密度で細胞を固定配置した細胞チップを使用するため、スクリーニングする範囲が狭まり、必要なプローブの量は μl オーダーの極微量とすることができる。例えば、 0.4 cm^2 の面積のウェルのカルチャースライドを用いた場合、最大 200,000 個の細胞のスクリーニングを $20\mu\text{l}$ のプローブを用いて行うことができる。

15

- 標的蛋白質とプローブとの結合において、プローブが既知物質または既知蛋白質である場合には、これに結合する未知蛋白質として標的蛋白質が同定される。一方、標的蛋白質が既知の場合には、この標的蛋白質と結合する新規の物質（例えば、薬剤開発のためのリード化合物等）や、標的蛋白質との結合が知られてい
- 20 ない蛋白質等がプローブの候補となる。

- プローブが蛋白質である場合、この「プローブ蛋白質」は標的蛋白質との特異的な結合性によって複数の標的候補蛋白質の中から目的とする蛋白質をスクリーニングするための蛋白質あるいはペプチドである。プローブ蛋白質は、ヒトを含
- 25 めたあらゆる生物種由来の、あらゆる蛋白質を対象とすることができる。その機能が既知であってもよく、あるいは機能未知のものであってもよい。プローブ蛋白質のアミノ酸配列、およびそれをコードする DNA 配列は未知であってもよいが、既知であることが好ましい。アミノ酸配列は、天然に存在する蛋白質由来の配列であっても、人工的にデザインした配列であってもよい。さらにこのプローブ蛋白質は、天然蛋白質のアミノ酸配列における一部連続配列からなるポリペプチド
- 30

またはオリゴペプチドであってもよい。

またプローブは、酵素、放射性同位体、蛍光色素などで標識されている。酵素は、代謝回転数が大であること、プローブ候補物質と結合させても安定であること、基質を特異的に着色させる等の条件を満たすものであれば特段の制限はなく、例えば、ペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、グルコース-6-リン酸化脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素等を用いることもできる。これら酵素とプローブ候補物質との結合は、マレイミド化合物等の架橋剤を用いる公知の方法によって行うことができる。基質としては、使用する酵素の種類に応じて公知の物質を使用することができる。例えば酵素としてペルオキシダーゼを使用する場合には、3,3',5,5'-テトラメチルベンジシンを、また酵素としてアルカリフォスファターゼを用いる場合には、パラニトロフェノール等を用いることができる。放射性同位体としては、 ^{125}I や ^3H 等の通常の RIA 等で用いられているものを使用することができる。蛍光色素としては、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) やテトラメチルローダミンイソチオシアネート (TRITC) 等の通常の蛍光法に用いられるものの他、緑色蛍光蛋白質等の蛍光蛋白質を使用することができる。ただし、蛍光色素または蛍光蛋白質等の発光物質を標識する場合には、識別コード付き細胞集団には含まれていない発光特性を有する発光物質を標識とすることが好ましい。

さらにまた、プローブは、プローブ蛋白質と蛍光蛋白質との融合蛋白質プローブとして標識化することができる。融合蛋白質プローブは、プローブ蛋白質遺伝子（例えばプローブ蛋白質をコードする cDNA 等）と、蛍光蛋白質遺伝子 (cDNA) との融合遺伝子を適当な宿主-ベクター系で発現させることによって作製することができる。あるいは融合遺伝子のインビトロ転写・翻訳産物としても得ることができる。

発光蛋白質融合プローブを、インビトロ転写・翻訳産物として調製する場合には、融合ポリヌクレオチドを、RNA ポリメラーゼプロモーターを有する発現ベクターに組換え、プ

ロモーターに対応する RNA ポリメラーゼを含むウサギ網状赤血球溶解物、小麦胚芽抽出物、大腸菌溶解物などのインビトロ転写・翻訳系に添加すれば、蛍光蛋白質融合プローブをインビトロで調製することができる。インビトロ転写とインビトロ翻訳は別々に行なっても良い。RNA ポリメラーゼプロモーターとしては、T7、T3、SP6 などが例示できる。これらの

5 RNA ポリメラーゼプロモーターを含むベクターとしては、pKA1、pCDM8、pT3/T7 18、pT7/3 19、pBluescript II、pIVEX 系などが例示できる。

蛍光蛋白質融合プローブを、大腸菌などの微生物を用いて調製する場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、DNA クローニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターに、融合ポリヌクレオチドを組換えた発現ベクター

10 を作成し、この発現ベクターで宿主細胞を形質転換したのち、得られた形質転換体を培養すれば、この融合ポリヌクレオチドがコードする融合蛋白質を微生物内で大量生産することができる。大腸菌用発現ベクターとしては、pUC 系、pBluescript II、pET 発現システム、pGEX 発現システムなどが例示できる。

15

蛍光蛋白質融合プローブを、真核細胞を用いて調製する場合には、融合ポリヌクレオチドを、プロモーター、スプライシング領域、ポリ (A) 付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターに組換え、真核細胞内に導入すれば、蛍光蛋白質融合プローブを真核細胞内で生産することができる。発現ベクターとしては、pKA1、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、

20 pBK-RSV、EBV ベクター、pRS、pYES2 などが例示できる。真核細胞としては、サル腎臓細胞 COS7、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO などの哺乳動物培養細胞、出芽酵母、分裂酵母、カイコ細胞、アフリカツメガエル卵細胞などが一般に用いられるが、蛍光蛋白質融合プローブを発現できるものであれば、いかなる真核細胞でもよい。

25 蛍光蛋白質融合プローブをインビトロ転写・翻訳あるいは原核細胞や真核細胞で発現させたのち、得られた細胞溶解物をそのままプローブとして用いることができる。もし、培養物から目的の蛍光蛋白質融合プローブを単離精製する場合には、公知の分離操作を組み合わせで行うことができる。例えば、尿素などの変性剤や界面活性剤による処理、超音波処理、酵素消化、塩析や溶媒沈殿法、透析、

30 遠心分離、限外濾過、ゲル濾過、SDS-PAGE、等電点電気泳動、イオン交換クロマ

トグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーなどがあげられる。

この発明のスクリーニング方法では、標識化プローブを細胞と接触させ、プローブからのシグナルを標識に対応する公知の方法で検出する。標識として酵素を用いる場合には、酵素作用によって分解して発色する基質を加え、基質の分解量を光学的に測定する。放射生同位体を用いる場合には、放射性同位体の発する放射線をオートラジオグラフィーなどにより検出する。また、蛍光色素または蛍光蛋白質を用いる場合には、蛍光顕微鏡を組み合わせた測定装置によって蛍光量を測定すればよい。ただし、細胞内に局在化させた標的蛋白質の場合には、蛍光標識プローブを用い、顕微鏡観察によって結合を検出する方法が好ましい。顕微鏡下で観察することによって、標的蛋白質を局在化させた部位に結合が認められるようであれば、その結合はプローブと標的蛋白質の結合である可能性が高い。なお、標的蛋白質が細胞内蛋白質、または標的蛋白質を細胞内に局在化させた細胞であって、細胞膜を透過できないプローブを用いる場合には、細胞を界面活性剤や有機溶剤で処理して、細胞膜を透過性にしてからプローブと反応させる。

実施例

20

次に実施例を示して、この出願の発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明はこれらの例に限定されるものではない。なお、DNA の組換えに関する基本的な操作および酵素反応は、文献 ("Molecular Cloning. A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989) に従った。制限酵素および各種修飾酵素は特に記載の無い場合宝酒造社製のものを用いた。各酵素反応の緩衝液組成、並びに反応条件は付属の説明書に従った。

25

実施例 1

30

識別コード付き細胞集団の作製

(1) 発現ベクターの作製

(1-1) 蛍光蛋白質発現ベクター

pEGFP-N1、pEYFP-N1、pDsRed2-N1 (いずれも Clontech 社) のそれぞれから調製した蛍光蛋白質 (EGFP、EYFP、DsRed2) の cDNA を含む *EcoRI*-*NotI* 断片を pKA1 (Kato et al., Gene 150:243-250, 1994) の *EcoRI*-*NotI* に挿入し、蛍光蛋白質発現ベクター pKA1-EGFP-N1、pKA1-EYFP-N1 および pKA1-DsRed2-N1 を作製した。

10 (1-2) 膜局在化蛍光蛋白質発現ベクター

ヒトグリコホリン C 様蛋白質 (GPCL) をコードする cDNA を有する pHP10524 (WO 00/00506 号公報に記載) を鋳型にして、T7 プライマーと、終止コドンの下流に *SmaI* 部位を付加したプライマーを用いて PCR 産物を調製した。この PCR 産物を *EcoRI* と *SmaI* で消化した後、前記 (1-1) で作製した蛍光蛋白質発現ベクター pKA1-EGFP-N1、pKA1-EYFP-N1 および pKA1-DsRed2-N1 のそれぞれの *EcoRI*-*SmaI* 開裂部位に挿入し、膜局在化蛍光蛋白質発現ベクター pKA1-GPCL-EGFP、pKA1-GPCL-EYFP および pKA1-GPCL-DsRed2 を作製した。融合蛋白質 GPCL-EGFP、GPCL-EYFP および GPCL-DsRed2 の模式図を図 2 (a) に示す。

20 (1-3) ミトコンドリア局在化蛍光蛋白質発現ベクター

ヒトミトコンドリア 3-ヒドロキシイソブチレートデヒドロゲナーゼ (MHIBDH) をコードする cDNA を有する pHP00698 (特開 2001-037482 号公報に記載) を鋳型にして、T7 プライマーと、終止コドンの下流に *BamHI* 部位を付加したプライマーを用いて PCR 産物を調製した。この PCR 産物を *EcoRI* と *BamHI* で消化した後、蛍光蛋白質発現ベクター pEGFP-N1、pEYFP-N1 および pDsRed2-N1 の *EcoRI*-*BamHI* 開裂部位に挿入し、ミトコンドリア局在化蛍光蛋白質発現ベクター pMHIBDH-EGFP、pMHIBDH-EYFP および pMHIBDH-DsRed2 を作製した。融合蛋白質 MHIBDH-EGFP、MHIBDH-EYFP および MHIBDH-DsRed2 の模式図を図 2 (b) に示す。

30 (1-4) 核局在化蛍光蛋白質発現ベクター

ヒトアシル CoA 結合蛋白質様蛋白質 (ACoABPL) をコードする cDNA を有する pHP01124 (特開 2001-333781 号公報に記載) を鋳型にして、T7 プライマーと、終止コドンの下流に *KpnI* 部位を付加したプライマーを用いて PCR 産物を調製した。この PCR 産物を *EcoRI* と *KpnI* で消化した後、前記 (1-1) で作製した蛍光蛋白質発現ベクター pKA1-EGFP-N1、pKA1-EYFP-N1 および pKA1-DsRed2-N1 の *EcoRI*-*KpnI* 開裂部位に挿入し、核局在化蛍光蛋白質発現ベクター pKA1-ACoABPL-EGFP、pKA1-ACoABPL-EYFP および pKA1-ACoABPL-DsRed2 を作製した。融合蛋白質 ACoABPL-EGFP、ACoABPL-EYFP および ACoABPL-DsRed2 の模式図を図 2 (c) に示す。

10 (1-5) 核小体局在化蛍光蛋白質発現ベクター

ヒト ATP-依存性 RNA ヘリカーゼ (ARH) をコードする cDNA を有する pHP02644 (特開 2001-218584 号公報に記載) を鋳型にして、T7 プライマーと、終止コドンの下流に *SmaI* 部位を付加したプライマーを用いて PCR 産物を調製した。この PCR 産物を *EcoRI* と *SmaI* で消化した後、前記 (1-1) で作製した蛍光蛋白質発現ベクター pKA1-EGFP-N1、pKA1-EYFP-N1 および pKA1-DsRed2-N1 の *EcoRI*-*SmaI* 開裂部位に挿入し、核小体局在化蛍光蛋白質発現ベクター pKA1-ARH-EGFP、pKA1-ARH-EYFP および pKA1-ARH-DsRed2 を作製した。融合蛋白質 ARH-EGFP、ARH-EYFP および ARH-DsRed2 の模式図を図 2 (d) に示す。

20 (2) 培養細胞への識別コードの付与

(2-1) 培養細胞

ヒトフィブ्रोサルコーマ細胞株 HT-1080 およびサル腎臓細胞 COS7 は、10%ウシ胎児血清 (FBS) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 中、5% CO₂ 存在下、37℃で培養した。2 × 10⁵ 個の HT-1080 細胞を 6 ウェルマルチディッシュ (ヌンク社) に植え、5% CO₂ 存在下、37℃で 22 時間培養した。培地除去後、リン酸緩衝液 (PBS) で細胞表面を洗浄し、さらに 10%FBS を含む DMEM 1.5 ml を添加した。

(2-2) 細胞への発現ベクターの導入

実施例 1 (1-2) ~ (1-5) で作製した発現ベクターを単独であるいは 2 種類組み合わせさせたものと、それぞれの組み合わせについてヒト完全長 cDNA バンク (加藤誠

志、BIO INDUSTRY 11:760-770, 1994) から選択した一種類の異なる cDNA 発現ベクターを対にして、それぞれの溶液 1 μ l (1.5 μ g 相当分) を無血清 DMEM 100 μ l に添加したのち、トランスフェクション試薬 PolyFect™ (キアゲン社) 10 μ l と混合し 10 分間室温でインキュベートすることによって DNA 複合体を形成した。前記 (2-1) の培養細胞 HT-1080 あるいは COS7 を PBS で一回洗浄し、10%FBS を含む DMEM 1.5 ml を添加した。先に調製した DNA 複合体に 10%FBS を含む DMEM 600 μ l を添加したものを、この細胞に添加し、5% CO₂ 存在下、37℃で 22 時間培養した。

10 (3) 発光局在パターンの観察

培養細胞を PBS で洗浄した後、4%パラホルムアルデヒド含有 PBS で室温 15 分間、固定した。これを共焦点蛍光顕微鏡 (Bio-Rad 社 MRC1024ES) で観察したところ、導入した融合蛋白質に応じて様々な発光パターンを示す細胞集団が得られた。この実施例では、局在が 1 部位と 2 部位、3 色の蛍光蛋白質を用いたので、それぞれ 12 種類と 54 種類、合計 66 種類の発光パターンを示す細胞集団が得られた。図 3 に局在が 2 部位の場合の発光パターンの一部を示す。(a) から (c) までは細胞膜と核小体、(d) と (e) が細胞膜とミトコンドリア、(f) から (h) までは核と核小体、(i) が細胞膜と核、(j) がミトコンドリアと核で、それぞれ異なる色の蛍光蛋白質が発現している HT-1080 細胞集団の例である。細胞の種類が異なっても基本的な発光パターンは変わらないが、局在の様子が少し異なる場合がある。例えば、COS7 細胞を用いて細胞膜に局在化させた場合、細胞膜全体が発光し、核の周辺の小胞体にも蓄積が見られる ((k) から (n) 参照)。このような違いがあっても、単独で発現させた場合のパターンを前もって確認しておけば、局在部位の識別に支障は来さない。それぞれの細胞は異なる標的蛋白質を発現しており、この細胞集団を用いて各種スクリーニングを行い、その結果選別された細胞の発光パターンを観察すれば、その発光パターン発現ベクターと一緒に導入した標的蛋白質発現ベクターがわかっているので、その細胞がどの標的蛋白質を発現しているかを直ちに同定することができる。

実施例 2

細胞チップの作製

(1) 細胞チップ A

- 5 実施例 1 (2-2) で作製した 5 種類の融合蛋白質発現細胞を、それぞれ 0.05%トリプシン-EDTA 溶液 1 ml と 37℃で 5 分間反応させて培養基材から剥離した。10% FBS を含む DMEM 2 ml を添加して細胞を回収したのち、これら 5 種類の融合蛋白質発現細胞を 2×10^5 細胞/ml になるように調製し、均一に混合した。この細胞混合懸濁液 1 ml をコラーゲン I カルチャー
- 10 スライド (ファルコン社) に蒔き、5% CO₂ 存在下、37℃でさらに 32 時間培養した。細胞を PBS で洗浄した後、4%パラホルムアルデヒド含有 PBS で室温 15 分間固定し、細胞チップ A を作製した。

この蛋白質チップ A を共焦点蛍光顕微鏡 (Bio-Rad 社 MRC1024ES) で観察し、チップ上の各細胞が発現する GFP 融合蛋白質に由来する蛍光を測定した。その結果を図 4 に示す。5 種類の融合蛋白質を発現した細胞が顕微鏡視野内に観察できる。この時の細胞の密度は、

15 約 1,300 個/mm²であった。

(2) 細胞チップ B

- 前記と同様にして、実施例 1 (1-1) で作製した pKA1-EGFP-N1 および pKA1 (対照ベクター) をそれぞれ導入した HT-1080 細胞を作製した。それぞれの細胞を 1:100 の割合で混合
- 20 し、この細胞混合懸濁液 100 μl を 16 ウェルチェンバーズスライド (ヌンク社) に植え、実施例 4 と同様の方法で細胞チップ B を作製した。

(3) 抗体を用いたスクリーニング

- 前記 (2) で作製した細胞チップ B を PBS で洗浄した後、0.1% Triton X-100 で処理した。
- 25 これに 10% Block Ace (大日本製薬社) 中で抗 GFP 抗体 20 μl を 90 分間反応させ、PBS 洗浄後、10% Block Ace 中でローダミン結合二次抗体と 40 分間反応させた。共焦点蛍光顕微鏡により抗体に由来する赤色蛍光の分布を観察した結果、赤色蛍光を発する細胞が、10 個/mm² の割合で見られた。赤色蛍光を発する細胞は、EGFP 本来の緑色蛍光をも示した。

- 以上の結果から、この発明の細胞チップは、微量のプロープ (抗体) を用いて、100 個
- 30 に 1 個の割合で含まれている標的蛋白質の有無を調べることが可能であることが確認され

た。

実施例 3

5 蛋白質-蛋白質相互作用のスクリーニング

核蛋白質である Npw38 と NpwBP との結合をモデル相互作用として選び、NpwBP をプローブ蛋白質、Npw38 を標的蛋白質としてスクリーニングを実施した例を示す。すなわち Npw38 の WW ドメインが、NpwBP の PGR モチーフに結合することが知られている (A. Komuro et al., J. Biol. Chem. 274: 36513-36519, 1999)。そこで、プローブ蛋白質として
10 NpwBP の PGR モチーフを含むペプチドを選択した。このペプチドを蛍光蛋白質と融合させたものを蛍光蛋白質融合プローブとして用い、膜局在化 Npw38 を発現した細胞を含む細胞チップをスクリーニングした (図 5 参照)。

15 (1) 発現ベクターの作製

(1-1) 蛍光蛋白質発現ベクター

pEGFP-N1、pDsRed2-N1 (いずれも Clontech 社) のそれぞれから調製した蛍光蛋白質 (EGFP、DsRed2) の cDNA を含む EcoRI-NotI 断片を pKA1 (Kato et al., Gene 150:243-250, 1994) の EcoRI-NotI に挿入し、蛍光蛋白質発現ベクター pKA1-EGFP-N1、pKA1-
20 DsRed2-N1 を作製した。

(1-2) 蛍光蛋白質融合プローブ発現ベクター

NpwBP の PGR モチーフペプチドと GFP との融合蛋白質 (図 6 (a) 参照) を発現するベクター pKA1-NpwBP (P2)-GFP (特開 2001-327296 号公報に記載) を蛍光蛋白質
25 融合プローブ発現ベクターとして用いた。このベクターは、cDNA の上流に T7 RNA ポリメラーゼプロモータが存在するので、T7 RNA ポリメラーゼを作用させると、インビトロで転写が起こり、融合蛋白質をコードする mRNA が合成できる (図 5 参照)。

30 (1-3) GPCL 融合蛋白質発現ベクターの作製

ヒトグリコホリン C 様蛋白質 (GPCL) をコードする cDNA を有する pHP10524 (WO 00/00506 号公報に記載) を鋳型にして、T7 プライマーと、終止コドンの下流に *Sma*I 部位を付加したプライマーを用いて PCR 産物を調製した。この PCR 産物を *Eco*RI と *Sma*I で消化した後、前記 (1-1) で作製した蛍光蛋白質発現ベクター pKA1-EGFP-N1、pKA1-DsRed2-N1 の
5 それぞれの *Eco*RI-*Sma*I 開裂部位に挿入し、膜局在化蛍光蛋白質発現ベクター pKA1-GPCL-EGFP、pKA1-GPCL-DsRed2 を作製した。

(1-4) GPCL-Npw38 融合蛋白質発現ベクターの作製

pKA1-Npw38 (A. Komuro et al., Nucl. Acids Res. 27: 1957-1965, 1999) を
10 鋳型にして、開始コドンの上流に *Sma*I 部位を付加したプライマーと、T3 プライマーを用いて PCR 産物を調製した。この PCR 産物を *Sma*I と *Not*I で消化した後、前記 (1-3) で作製した膜局在化蛍光蛋白質発現ベクター pKA1-GPCL-EGFP の *Sma*I-*Not*I 開裂部位に挿入し、GPCL-Npw38 融合蛋白質発現ベクター pKA1-GPCL-Npw38 を作製した。融合蛋白質 GPCL-Npw38 の模式図を図 6 (b) に示す。

15

(1-5) GPCL-Npw38-DsRed2 融合蛋白質発現ベクターの作製

pKA1-Npw38 を鋳型にして、開始コドンの上流に *Sma*I 部位を付加したプライマーと、Npw38 の内部にある *Sma*I 部位を含むプライマーを用いて PCR 産物を調製した。この PCR 産物を *Xma*I で消化した後、前記 (1-3) で作製した膜局在化蛍光蛋白質発現ベクター
20 pKA1-GPCL-DsRed2 の *Xma*I 開裂部位に挿入し、GPCL-Npw38-DsRed2 融合蛋白質発現ベクター pKA1-GPCL-Npw38-DsRed2 を作製した。融合蛋白質 GPCL-Npw38-DsRed2 の模式図を図 6 (c) に示す。

(2) 細胞チップの作製

25 (2-1) 培養細胞

ヒトフィブロサルコーマ細胞株 HT-1080 は、10%ウシ胎児血清 (FBS) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 中、5% CO₂ 存在下、37℃で培養した。2 × 10⁵ 個の HT-1080 細胞を 6 ウェルマルチディッシュ (ヌンク社) に植え、5% CO₂ 存在下、37℃で 22 時間培養した。培地除去後、リン酸緩衝液 (PBS) で細胞表面を洗浄し、さらに 10%FBS を含む DMEM 1.5 ml
30 を添加した。

(2-2) 細胞への発現ベクターの導入

実施例 3 (1-2) と (1-3) で作製した発現ベクター (pKA1-GPCL-Npw38、pKA1-GPCL-Npw38-DsRed2、あるいは GPCL のみを発現する対照ベクターとして pHP10524) の溶液 1 μ l (1.5 μ g 相当) を無血清 DMEM 100 μ l に添加したのち、トランスフェクション試薬 PolyFect™ (キアゲン社) 10 μ l と混合し 10 分間室温でインキュベートすることによって DNA 複合体を形成した。前記 (2-1) の培養細胞 HT-1080 を PBS で一回洗浄し、10%FBS を含む DMEM 1.5 ml を添加した。先に調製した DNA 複合体に 10%FBS を含む DMEM 600 μ l を添加したものを、この細胞に添加し、5% CO₂ 存在下、37℃で 22 時間培養した。

10

(2-3) 融合蛋白質発現細胞の担体への固定

前記 (2-2) で作製した融合蛋白質発現細胞を、それぞれ 0.05%トリプシン-EDTA 溶液 1 ml と 37℃で 5 分間反応させて培養基材から剥離した。10% FBS を含む DMEM 2 ml を添加して細胞を回収したのち、この融合蛋白質発現細胞を 2×10^5 細胞/ml になるように調製し、GPCL のみを発現させた細胞と均一に混合した。この細胞混合懸濁液 1 ml をコラーゲン I カルチャースライド (ファルコン社) に蒔き、5% CO₂ 存在下、37℃でさらに 40 時間培養した。細胞を PBS で洗浄した後、細胞を PBS で洗浄した後、4%パラホルムアルデヒド含有 PBS で室温 15 分間固定し、細胞チップを作製した。

15

(3) 蛍光蛋白質融合プローブの調製

前記 (1-2) に記載した pKA1-NpwBP (P2)-GFP 1 μ g を、インビトロ転写/翻訳反応キット (プロメガ社) に付属の T_NT^R Quick Master Mix 40 μ l、1 mM メチオニン 1 μ l を含む総量 50 μ l の溶液に添加して、30℃で 12 時間反応させた。この反応液をそのままスクリーニング用プローブとして用いた。反応液の一部をとって PBS で 200 倍希釈したのち、蛍光分光光度計で蛍光スペクトル (励起光: 488 nm) を測定した結果を図 7 に示す。510 nm に極大を持つ蛍光発光が観測され、翻訳産物である融合蛋白質 NpwBP (P2)-GFP が、GFP として機能していることが示された。

25

(4) 蛍光蛋白質融合プローブを用いたスクリーニング

前記 (2) で作製した GPCL-Npw38 発現細胞を含む細胞チップを PBS で洗浄した後、0.1%

30

Triton X-100 で氷上 15 分間処理した。このチップ上の細胞に前記 (3) で調製した蛍光蛋白質融合プローブ NpwBP (P2) -GFP 20 μ l を添加して封入後、4℃で 20 時間反応させた。0.05 % Tween20 含有 PBS で 3 回洗浄後、封入し共焦点蛍光顕微鏡 (Bio-Rad 社 MRC1024ES) で観察した。その結果、核の周辺部の小胞体に緑色蛍光を発する細胞が認められた (図 8(a)、(b))。この蛍光発光部位が、GPCL-Npw38 の局在と一致することを確認するために、GPCL-Npw38 にさらに赤色蛍光蛋白質 DsRed2 を融合させた GPCL-Npw38-DsRed2 を発現させた細胞を含む細胞チップを用いて、同様の実験を行なった。その結果、GPCL-Npw38 の場合と同様に、核の周辺部の小胞体に緑色蛍光を発する細胞が認められた (図 8(c))。しかも、この緑色蛍光発光部位は、GPCL-Npw38-DsRed2 の局在部位を示す赤色蛍光発光部位と一致したことから (図 8(d)、(e))、蛍光蛋白質融合プローブ NpwBP (P2) -GFP は、GPCL-Npw38-DsRed2 と結合していることが確認された。なお、GPCL のみを発現している細胞には、プローブの結合は認められないことから、この結合は Npw38 を介していることが示された。

15

産業上の利用可能性

以上詳しく説明したとおり、この出願によって、特別な装置を必要とせずに簡便に作製することができ、大規模なスクリーニングを固相系および液相系においても実施することができ、しかも標的蛋白質の発現を含めた様々な細胞の性質についてのスクリーニングにも適用可能な新しい細胞集団が提供される。

20

請求の範囲

1. 発光物質の発する発光シグナルの違いによって個々に識別可能な細胞の集団であって、発光シグナルの違いが、
 - 5 (a) 発光特性が異なる 2 以上であること；
 - (b) 発光部位が異なる 2 以上であることのいずれか一方または両方である識別コード付き細胞集団。
2. 一部または全ての細胞の発光物質が蛍光蛋白質である請求項 1 の識別コード
10 付き細胞集団。
3. 一部または全ての細胞が蛍光蛋白質と局在化シグナルペプチドとの融合蛋白質を発現する請求項 1 または 2 の識別コード付き細胞集団。
- 15 4. 各細胞がそれぞれに異なる性質を有する細胞である請求項 1 の識別コード付き細胞集団。
5. 異なる性質が異なる標的蛋白質の発現である請求項 4 の識別コード付き細胞
20 集団。
6. 細胞が真核細胞である請求項 5 の識別コード付き細胞集団。
7. 真核細胞が哺乳動物細胞である請求項 6 の識別コード付き細胞集団。
- 25 8. 担体上の微小領域に高密度で固定配置されている請求項 4 から 7 のいずれかの識別コード付き細胞集団。
9. 請求項 4 から 8 のいずれかの細胞集団の各細胞にプローブを接触させ、細胞の発光シグナルを指標としてプローブと結合する細胞の性質を同定することを特徴とする細胞性質スクリーニング方法。
30

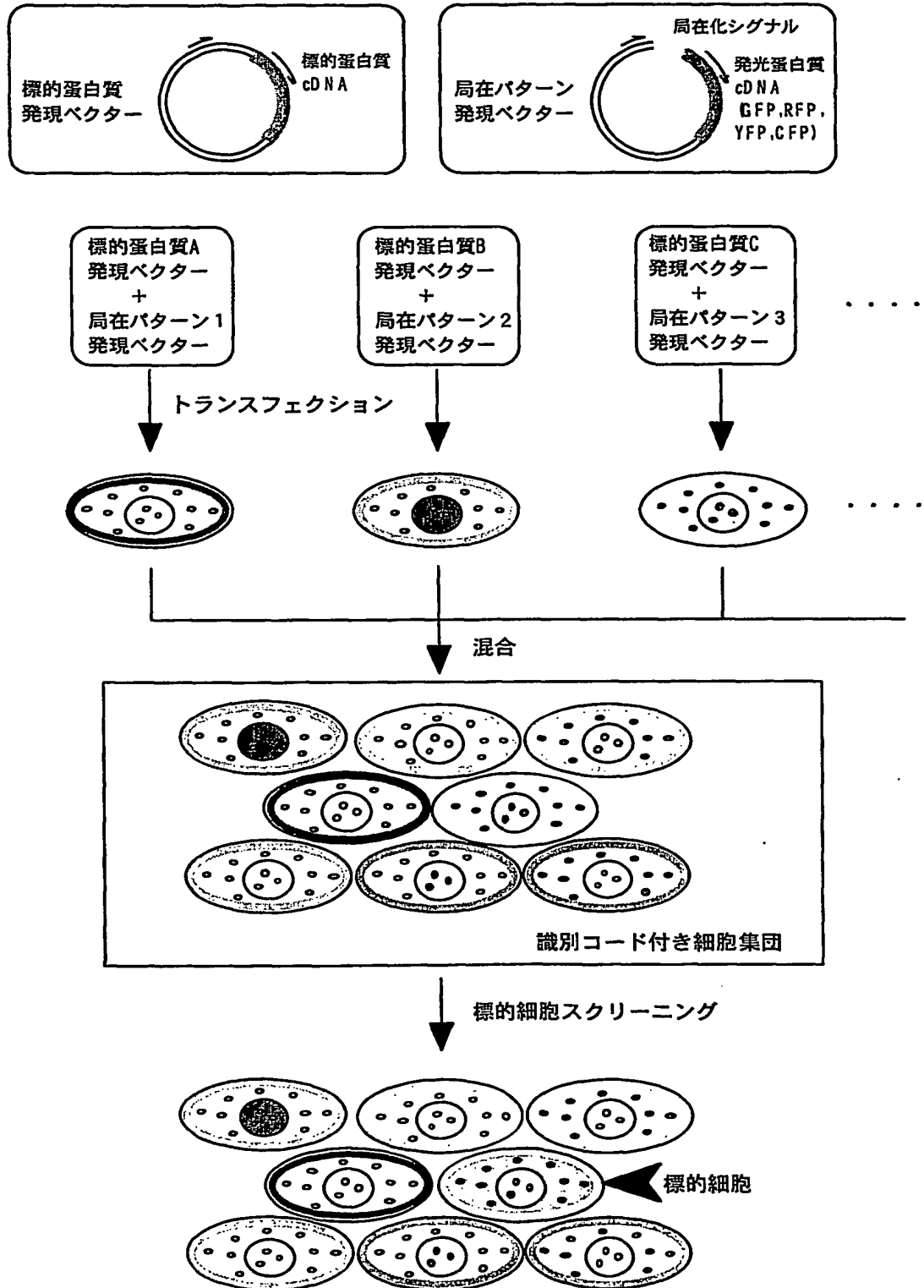
10. プローブがプローブ蛋白質と蛍光蛋白質との融合蛋白質プローブである請求項 9 のスクリーニング方法。

5 11. 蛍光蛋白質が、識別コード付き細胞集団が有する発光特性とは異なる発光特性を有する請求項 10 のスクリーニング方法。

12. 融合蛋白質プローブが、プローブ蛋白質遺伝子と蛍光蛋白質遺伝子との融合遺伝子のインビトロ転写・翻訳産物である請求項 10 または 11 のスクリーニング
10 方法。

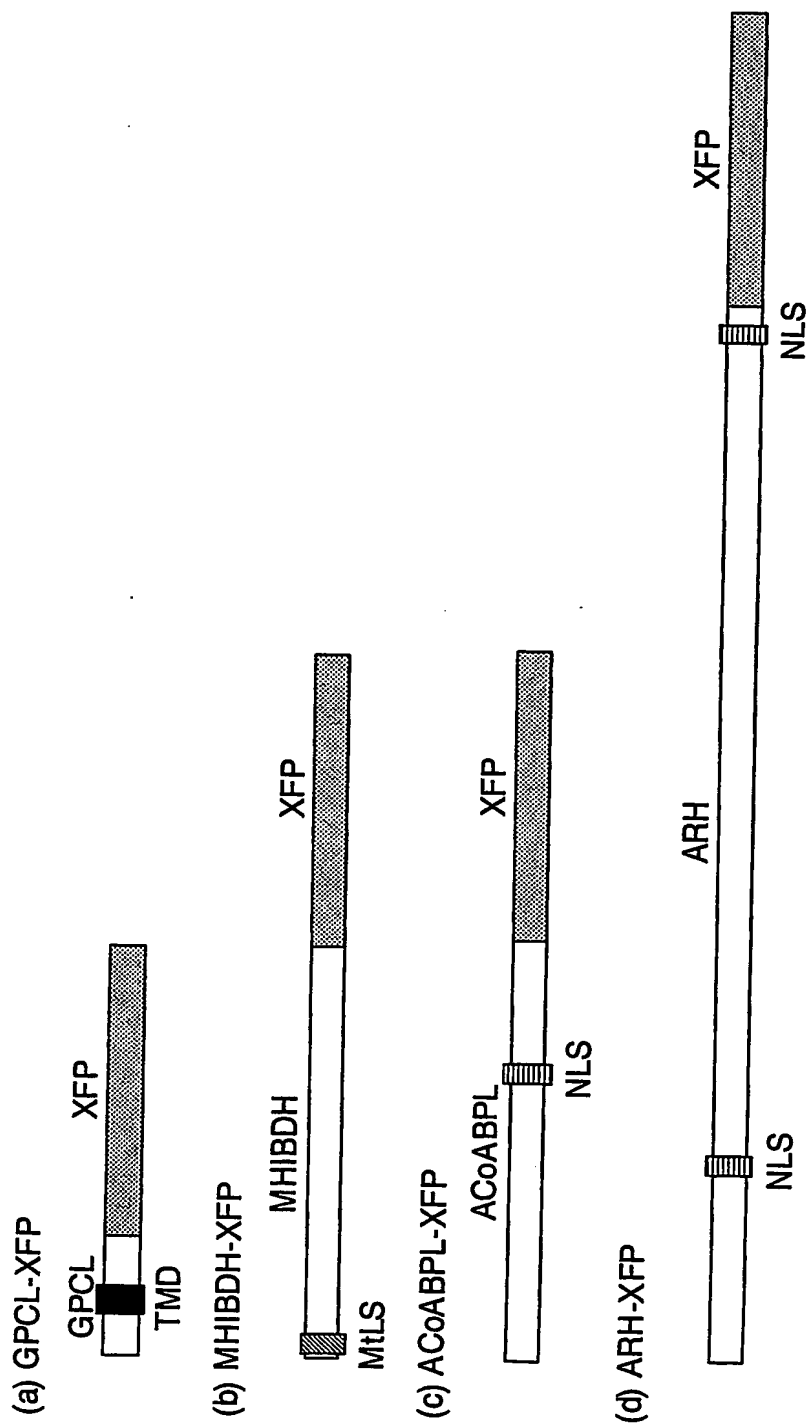
1/8

図 1



2/8

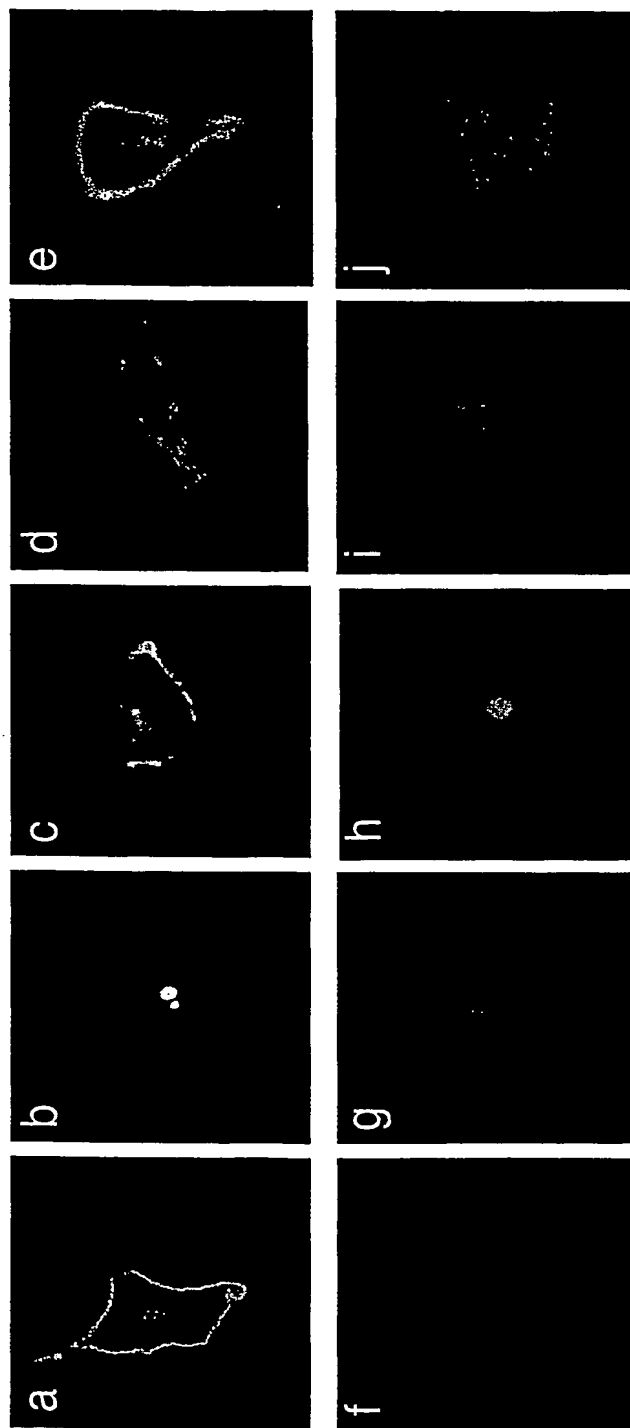
2



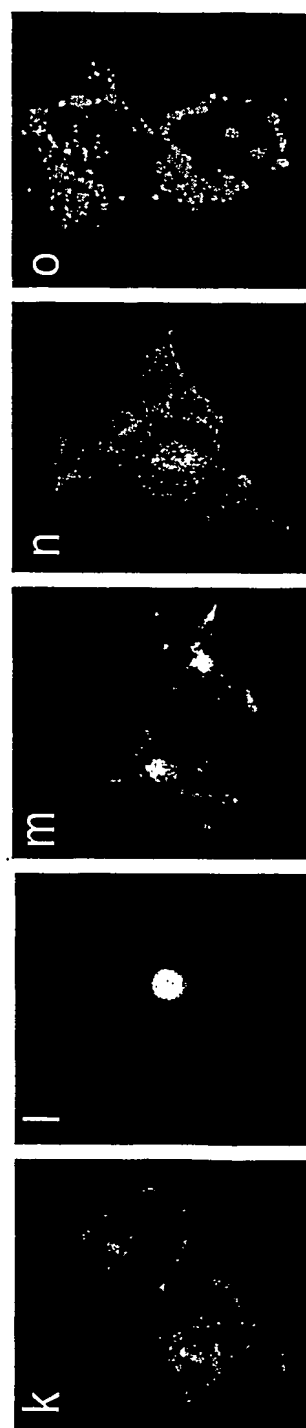
3/8

☒ 3

HT-1080

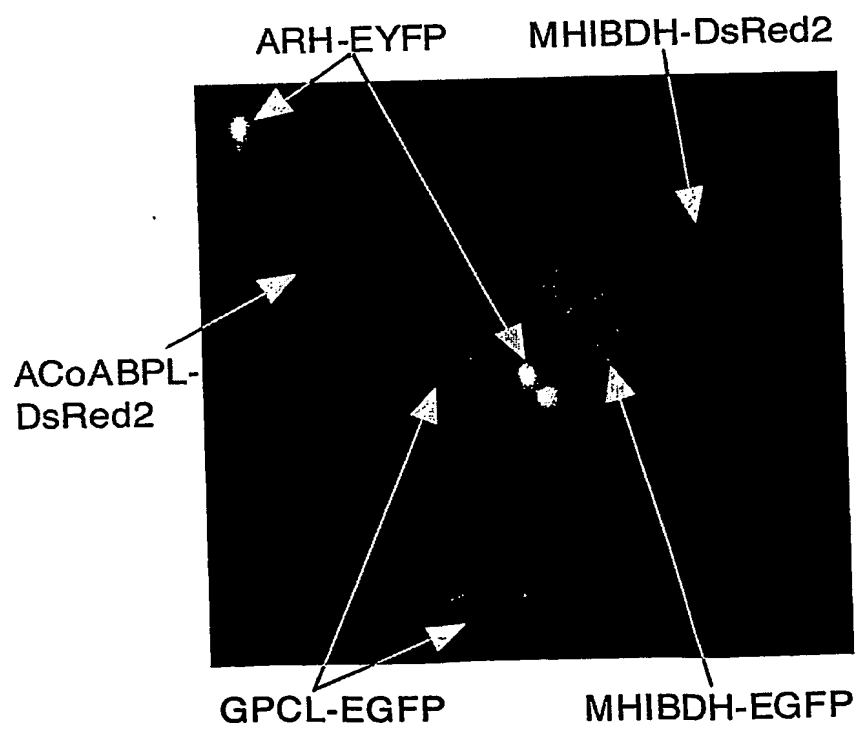


COS7



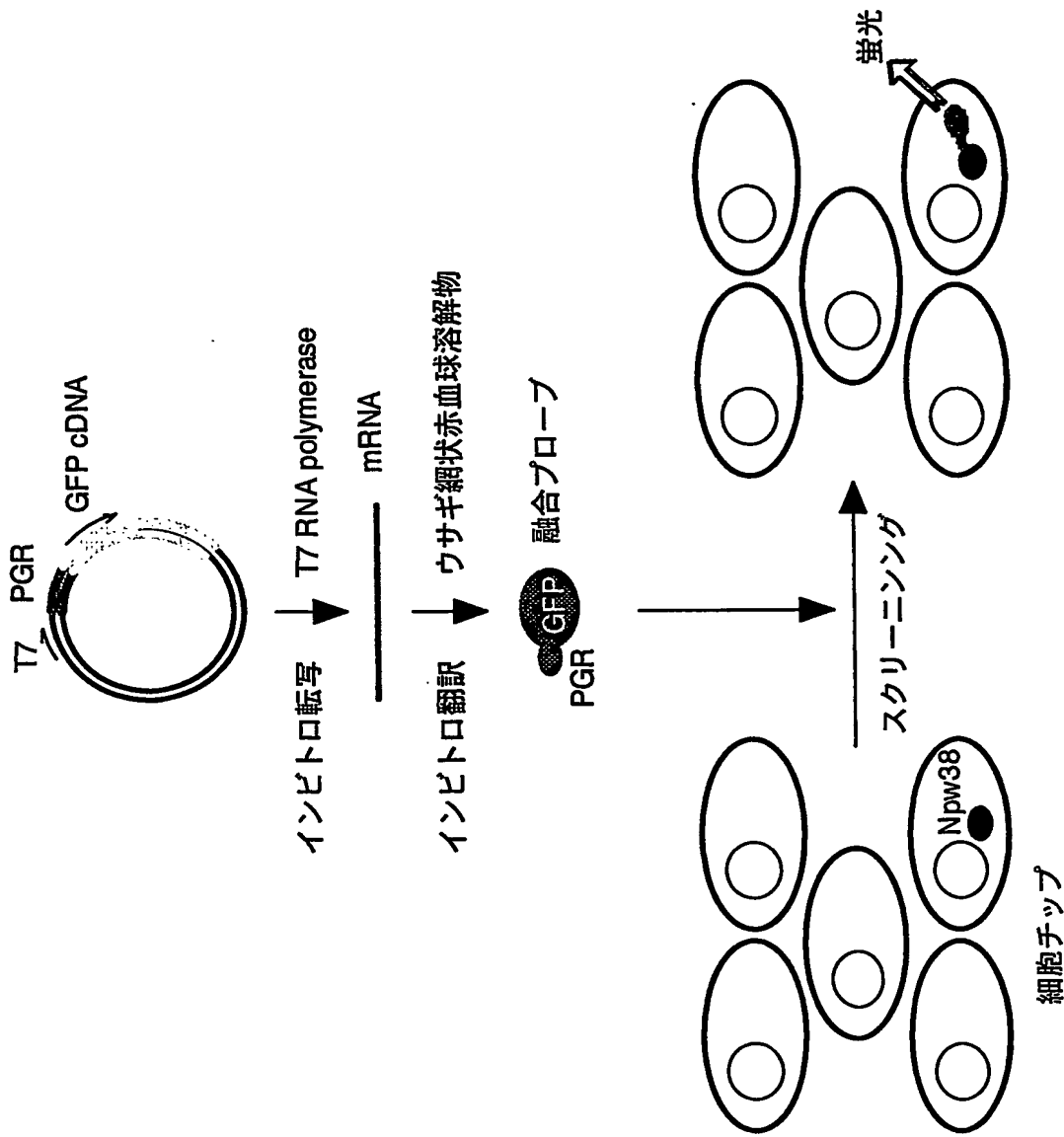
4/8

図 4



5/8

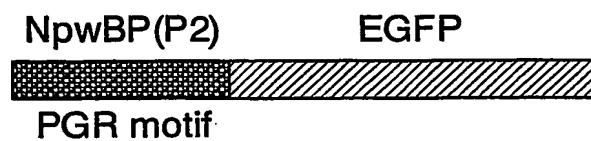
図 5



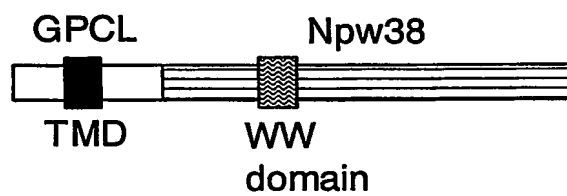
6/8

6

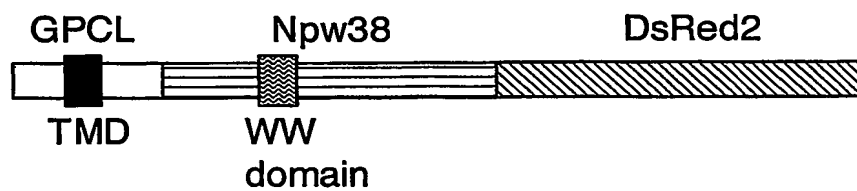
(a) NpwBP(P2)-EGFP



(b) GPCL-Npw38

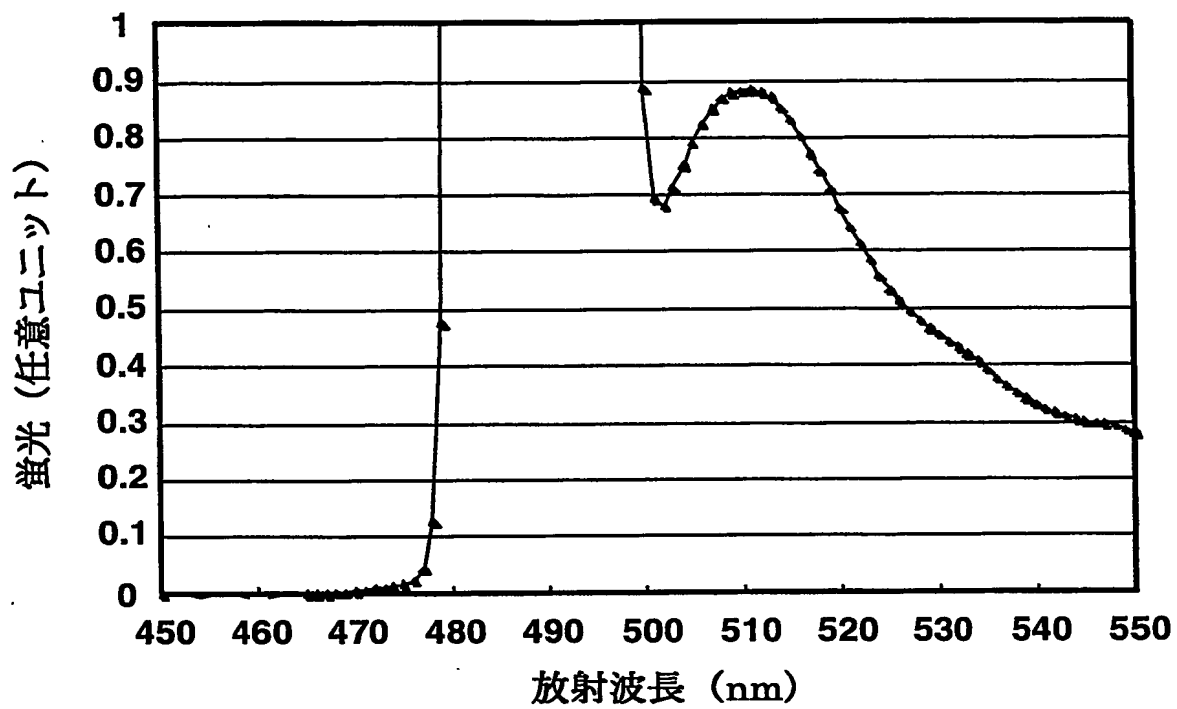


(c) GPCL-Npw38-DsRed2



7/8

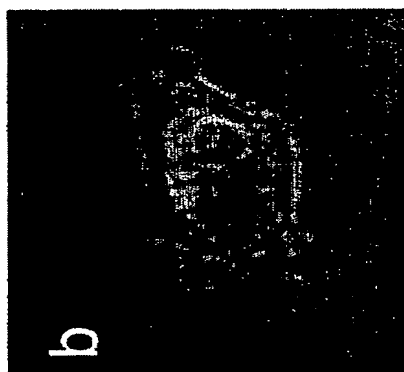
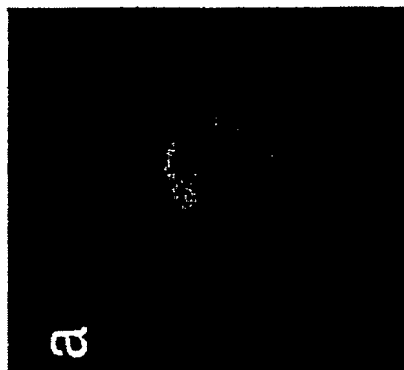
図 7



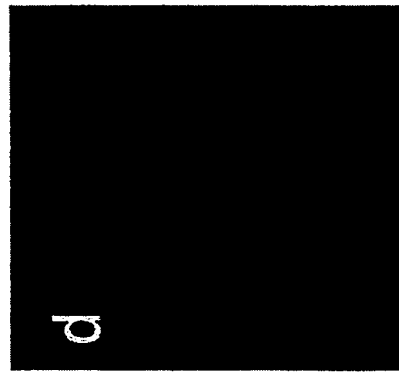
8/8

☒ 8

GPCL-Npw38 + NpwBP(P2)-EGFP



GPCL-Npw38-DsRed2 + NpwBP(P2)-EGFP



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/04180

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, 5/10, C12Q1/02, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00-15/90, 5/10, C12Q1/00-1/70, G01N21/75-21/83,
21/62-21/74

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE (STN), WPI/BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>P, X</u> <u>P, A</u>	Fumie FUJIMORI et al., "Shikibetsu Code tsuki Saibo Chip", Seikagaku, August 2002, Vol.74, No.8, page 1095	<u>1-8</u> <u>9-12</u>
<u>Y</u> <u>A</u>	JP 11-146798 A (Railway Technical Research Institute), 02 June, 1999 (02.06.99), (Family: none)	<u>1-8</u> <u>9-12</u>
<u>Y</u> <u>A</u>	EP 121262 A2 (Becton, Dickinson and Co.), 10 August, 1984 (10.10.84), & JP 59-184862 A	<u>1-8</u> <u>9-12</u>
<u>Y</u> <u>A</u>	JP 9-56384 A (Toray Industries, Inc.), 04 March, 1997 (04.03.97), (Family: none)	<u>1-8</u> <u>9-12</u>

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
17 April, 2003 (17.04.03)

Date of mailing of the international search report
30 April, 2003 (30.04.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/04180

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>Y</u> A	WO 91/01305 A1 (University of Wales College of Medicine), 07 February, 1991 (07.02.91), & EP 484369 A1 & US 5683888 A	<u>1-8</u> 9-12
<u>Y</u> A	WO 00/17221 A1 (Duke University), 30 March, 2000 (30.03.00), & EP 1115734 A1	<u>1-8</u> 9-12
A	KOMURO A. et al., Association of Two Nuclear Proteins, Npw38 and NpwBP, via the Interaction between the WW Domain and a Novel Proline-rich Motif Containing Glycine and Arginine. J.Biol.Chem., 1999, Vol.274, No.51, pages 36513 to 36519	1-12

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 15/09, 5/10, C12Q 1/02, G01N 33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 15/00-15/90, 5/10, C12Q 1/00-1/70, G01N 21/75-21/83, 21/62-21/74

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), WPI/BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X P, A	藤森 史江 他, 識別コード付き細胞チップ, 生化学, 8月. 2002, 第74巻, 第8号, p. 1095	1-8 9-12
Y A	JP 11-146798 A (財団法人鉄道総合技術研究所) 1999. 06. 02 (ファミリーなし)	1-8 9-12
Y A	EP 121262 A2 (Becton, Dickinson and Company) 1984. 10. 10 & JP 59-184862 A	1-8 9-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 04. 03

国際調査報告の発送日

30.04.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

三原 健治

4N

2937

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>Y</u> A	JP 9-56384 A (東レ株式会社) 1997. 03. 04 (ファミリーなし)	<u>1-8</u> 9-12
<u>Y</u> A	WO 91/01305 A1 (UNIVERSITY OF WALES COLLEGE OF MEDICINE) 1991. 02. 07 & EP 484369 A1 & US 5683888 A	<u>1-8</u> 9-12
<u>Y</u> A	WO 00/17221 A1 (DUKE UNIVERSITY) 2000. 03. 30 & EP 1115734 A1	<u>1-8</u> 9-12
A	KOMURO A. et al. Association of Two Nuclear Proteins, Npw38 and NpwBP, via the Interaction between the WW Domain and a Novel Proline-rich Motif Containing Glycine and Arginine. J. Biol. Chem. 1999, Vol. 274, No. 51, p. 36513-36519	1-12

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.